

Química verde para el tratamiento de la psoriasis: screening de microorganismos hidroxilantes

Javier Andrés Soto

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

La psoriasis es una enfermedad cutánea que aunque en muy pocos casos compromete seriamente la salud de los pacientes, si tiene un fuerte impacto psicológico en una gran mayoría de ellos. GSK comercializa en Estados Unidos un fármaco cuyo principio activo se obtiene a través de procesos químicos muy complejos y costosos. Alternativas que permitan mejorar la producción industrial de esta molécula mejorarían la calidad de vida de un gran número de pacientes. Diferentes autores han descrito microorganismos capaces de realizar la biotransformación de interés, mediante procesos seguros comparados con la síntesis orgánica convencional, y respetuosos con el medio ambiente (baja emisión de contaminantes y poco consumo de energía). El desarrollo de este proyecto consistió en la búsqueda de microorganismos que realicen la hidroxilación en la posición C1 de un sustrato natural; encontrándose en la colección de microorganismos de GSK cepas salvajes capaces de producir la transformación del sustrato siendo en algunos casos el rendimiento mayor que el descrito.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, catelicidina, inflamósoma, psoriasis, queratinocito, biotransformación, "screening", hidroxilación, DNA-citosólico.

Cita: Soto J A (2013) Química verde para el tratamiento de la psoriasis: screening de microorganismos hidroxilantes. *Dianas* 2(1): e20130306. ISSN 1886-8746 dianas.20130306 URI

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 6 de julio, 2012

Copyright: © 2013 Soto J A. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

*E-mail: andres.soto@edu.uah.es



Introducción

Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad de etiología desconocida que afecta más o menos al 2% de la población española, y en un porcentaje similar a la población mundial (1). Esta patología es de curso crónico y no tiene cura. La principal característica clínica es la presencia de lesiones eritematoescamosas que forman placas localizadas con abundante riego sanguíneo, localizadas principalmente en codos, rodillas y zona lumbar. La aparición de este tipo de lesiones está mediada por la infiltración de linfocitos T activados, particularmente linfocitos Th1 (CD8) (2). Los pacientes que padecen psoriasis tienen un curso natural de brotes, seguidos de remisiones temporales. Existen diversos factores que pueden exacerbar o disparar estos brotes. Dentro de estos factores se encuentran la exposición a virus como el HIV, antígenos estreptocócicos, drogas como el litio, beta bloqueadores, antimaláricos y corticosteroides (3,4). Los pacientes sin antecedentes genéticos sufren brotes esporádicos, pero en personas con antecedente familiar, su curso se vuelve más complejo. Tener psoriasis aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardíacas.

La psoriasis se caracteriza por tres importantes sucesos a nivel histológico: la hiperplasia epidérmica, vasos sanguíneos prominentes en la dermis y un infiltrado inflamatorio de leucocitos. Las principales citoquinas halladas en los infiltrados de pacientes psoriáticos son IL-1, TNF α e INF γ , IL-17, IL-20 e IL-22 (5). Este "pool" de citoquinas tiene su acción sobre las células dérmicas y epidérmicas, alterando así la expresión de genes y la maduración de queratinocitos, entre otras células. Los queratinocitos de pacientes con psoriasis alcanzan la superficie de la piel en apenas 6-8 días, mientras que los de un individuo sano lo hacen aproximadamente en 40 días (6).

Psoriasis a nivel molecular.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) por sus siglas en inglés, son pequeñas proteínas con un amplio espectro de actividad antimicrobiana en contra de bacterias, virus y hongos (7,8). Muchas de estas moléculas han sido encontradas en una variedad de tejidos, entre ellos el epitelio de la piel. Entre los AMPs, el péptido LL-37 de la catelicidina, es la forma humana que ha sido descrita como “upregulated” en la psoriasis (9) y su presencia está aumentada en los queratinocitos de las placas psoriáticas. Los mecanismos subyacentes a la regulación de los AMPs no están dilucidados del todo, sin embargo, algunos datos indican que el principio activo del fármaco que GSK comercializa en Estados Unidos puede estar involucrado en el control de su expresión. Recientemente se ha descrito que nuestro compuesto está relacionado con la inducción de la parada en el crecimiento de los queratinocitos, su diferenciación y cambios en la expresión de citoquinas, y además ha sido asociada con el incremento del péptido LL-37 en queratinocitos cultivados y en piel humana *in vivo*. Ya que la catelicidina al ser un AMPs se comporta como una molécula proinflamatoria, las estrategias dirigidas a disminuir su expresión en los queratinocitos deberían tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la psoriasis, sin embargo esto no es así. Paradójicamente desde hace tiempo, análogos del principio activo del fármaco que GSK comercializa en Estados Unidos, se vienen usando eficazmente en el manejo de esta patología.

La paradoja.

Se ha mencionado la paradoja existente entre los tratamientos empleados en la psoriasis y lo que acontece a nivel molecular en los queratinocitos, teniendo como protagonistas a los AMPs, específicamente la catelicidina y a nuestro compuesto de estudio. La inducción de la expresión de catelicidina supuestamente empeoraría la inflamación, sin embargo esto no es así, ya que se mejora la inflamación y se revierten los cambios morfológicos en las lesiones. Un estudio reciente menciona al DNA citosólico como una señal que origina el proceso inflamatorio y a la IL-1 β como principal citoquina proinflamatoria. Los queratinocitos producen esta citoquina y elevadas cantidades de ésta son encontradas en lesiones psoriáticas (1,10) en donde activa a los linfocitos infiltrantes (11). La actividad biológica de esta citoquina se regula de manera transcripcional y postranscripcional. A nivel postranscripcional la IL-1 β es activada por el procesamiento proteolítico de su proforma. Esta ruptura se media por los llamados inflamosomas, los cuales son complejos inmunes formados posteriormente al reconocimiento de ciertos patrones moleculares. La activación de estos complejos permite la activación de las caspasa 1, la cual una vez activada media la ruptura de la IL-1 β para convertirla en su forma activa y secretada (figura 1) (12).

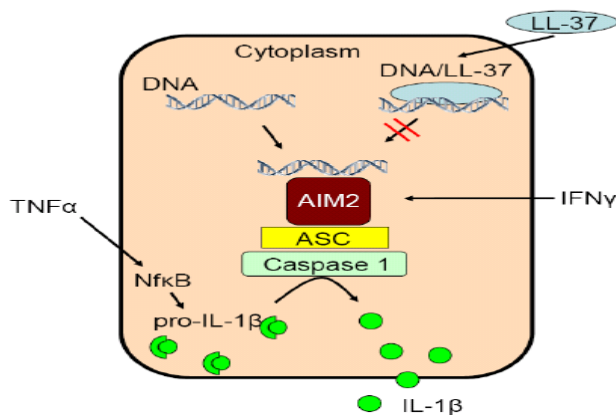


Figura1: Mecanismo de patogenia en la psoriasis. (Dombrowsky et al 2011)

Fisiológicamente el DNA intracelular se encuentra en el núcleo y en la mitocondria, pero no en el citosol y al parecer este tipo de DNA se conjuga con el péptido LL-37 formando complejos DNA propio/LL-37 (figura1). Estos fragmentos de DNA citosólico no han sido detectados en piel sana, pero si se ha hallado un nivel aumentado en las lesiones psoriáticas, así como una actividad elevada del inflamosoma AIM2 (13), gracias a la presencia de este DNA (13). Este hallazgo explicaría el por qué la abundante presencia de la catelicidina, la cual es una molécula proinflamatoria, no empeora el curso de la enfermedad. A mayor presencia de catelicidina, mayor conjugación de ésta con el DNA citosólico y menor activación de los inflamosomas. De hecho, los tratamientos actuales buscan aumentar la catelicidina en los queratinocitos incrementando la presencia del principio activo, porque como ya se ha mencionado, es éste quien controla la expresión de catelicidina en humanos y hasta la fecha es el único factor conocido que la regula positivamente.

Síntesis y metabolismo de la diana.

Nuestro compuesto es una molécula de origen biológico y como tal, posee una ruta metabólica que permite su transformación en un compuesto activo, que es el que finalmente ejerce su actividad. A pesar

de que esta molécula lleva a cabo su actividad biológica en células humanas, han sido identificados microorganismos que igualmente lo metabolizan, siendo este hecho el tema central del proyecto de investigación.

Esta molécula es de naturaleza lipofílica y en el humano pasa por ciertas hidroxilaciones para convertirse en su forma activa. Estas formas activas están involucradas profundamente en la homeostasis de otras sustancias biológicas, en la diferenciación y reproducción celular, y en el ajuste de la inmunidad entre otras funciones. Una vez que las preformas del compuesto isomerizan entre sí, la molécula es llevada al hígado en donde pasa por su primera modificación debido a la acción de la hidroxilasa 25, posiblemente codificada por *CYP2R1*, para producir así la forma circulatoria de la diana 25 hidroxilada. Su principal rol es servir como precursor para la forma activa $1\alpha,25(\text{OH})_2$, la cual es originada predominantemente en el riñón. La enzima responsable de esta hidroxilación es la $25\text{ OH }1\alpha$ hidroxilasa, codificada por *CYP27B1*. La forma $1\alpha,25\text{OH}_2$ se une específicamente a un receptor nuclear y a través de un complejo sistema de factores de transcripción, co-represores y co-activadores incrementa la transcripción de ciertos genes, entre ellos el gen responsable de la expresión de catelicidina.

Biosíntesis por microorganismos.

Estrategias de síntesis química para producir masivamente estas moléculas, requieren 20 etapas consiguiéndose eficiencias de alrededor de un 1%, incrementándose los costes para conseguir un producto puro que pueda ser usado farmacéuticamente en procesos de manufactura de medicamentos. Una de las etapas limitantes es la hidroxilación enantioselectiva de la posición C1. Como alternativa al método químico existe la bioconversión microbiana. Existe un actinomiceto descrito en la literatura que tiene la capacidad de transformar el sustrato adicionado al cultivo, a la forma $1\alpha,25\text{OH}_2$. Esta conversión catalizada por las enzimas de los microorganismos ocurre en una sola etapa y muestra una alta regio y estereo selectividad.

Métodos

El objetivo de este proyecto es identificar microorganismos que sean capaces de llevar a cabo la hidroxilación específica del sustrato, con el fin de encontrar cepas salvajes nuevas que puedan llevar a cabo este proceso y que sean eficaces en el momento de realizarlo, para así lograr un escalado a nivel comercial y el desarrollo de un fármaco económico para el tratamiento de la psoriasis. Para tal fin, el proyecto se estructuró en tres aspectos fundamentales para su desarrollo. Ellos fueron: fermentación de los microorganismos en presencia del sustrato, desarrollo de un ensayo bioquímico para determinar la presencia del metabolito de interés y uso de la cromatografía de alta eficacia y espectrometría de masas para la confirmación de la biotransformación.

Fermentación de microorganismos.

Especímenes.

GSK cuenta con una colección de microorganismos de aproximadamente 6630 especímenes, distribuidos así: hongos 45%, levaduras 4.5%, bacterias 9.8% y actinomicetos 40.7%. Las cepas se encuentran congeladas en glicerol a -80°C y por triplicado. Los actinomicetos son el único grupo taxonómico descrito capaz de realizar la hidroxilación en C1 del sustrato. El proyecto priorizó el trabajo con actinomicetos y bacterias, con el fin de encontrar de forma rápida algún "hit" prometedor.

Fermentaciones.

La condiciones de cultivo variaron dependiendo de cada grupo taxonómico respecto a volumen de inóculo, tiempo de crecimiento, medios de cultivo y tiempo de adición del sustrato al cultivo. La estrategia incluye el crecimiento de cada microorganismo en dos medios de cultivo líquido muy diferentes en su composición, con el propósito de favorecer la biotransformación (Tabla 1)

Recogida y dispensación de los extractos.

Una vez finalizado el tiempo de crecimiento, en primer lugar aproximadamente 12 ml de los caldos de cultivo se transfieren desde el erlenmeyer a tubos falcon de 15ml y se centrifugan durante 20 minutos a 3000 r.p.m. (100g) a 4°C . Los sobrenadantes (extractos) obtenidos se dispensan en placas de 384 pocillos en un volumen de 150 μl . Esta dispensación la hace el TECAN GENESIS RSP 150[®] generando placas madre por triplicado que se almacenan selladas a -20°C para posteriores usos. Se les llama placas madre porque desde éstas se originan dos copias idénticas de placas hijas, transfiriendo con el CYBI WELL[®] un volumen de 1 μl , estas placas se utilizan inmediatamente para realizar el ensayo bioquímico.

Ensayo bioquímico (TR-FRET).

Para determinar la presencia de producto de la hidroxilación en los extractos se lleva a cabo una primera criba, mediante un ensayo bioquímico basado en la transferencia retardada de fluorescencia. Si el compuesto está presente esta fluorescencia aumenta de manera significativa. La técnica TR-FRET (*time resolve-fluorescent resonance energy transfer*) usa un donante que en este caso es el Terbio, el cual es un lantánido que posee una vida media de excitación prolongada, y un aceptor, que es un péptido coactivador. Si la molécula de interés está presente, el donador y el aceptor se aproximan y esto causa un incremento en la señal de TR-FRET (figura 2A).

LEVADURAS	
Medios de cultivo	E y F
Volumen de medio	50 ml
Volumen de inóculo	100 µl
Tiempo de crecimiento antes de la adición de la diana.	24 horas
Concentración de la diana	100 µg/ml
Volumen de la diana	1 ml
Tiempo de crecimiento para recogida de extractos.	72 horas
Temperatura de crecimiento	28°C

BACTERIAS	
Medios de cultivo	C y D
Volumen de medio	20 ml
Volumen de inóculo	40 µl
Tiempo de crecimiento antes de la adición de la diana.	0 horas
Concentración de la diana	100 µg/ml
Volumen de la diana	0.5 ml
Tiempo de crecimiento para recogida de extractos.	48 horas
Temperatura de crecimiento	28°C

ACTINOMICETOS	
Medios de cultivo	A y B
Volumen de medio	50 ml
Volumen de inóculo	100 µl
Tiempo de crecimiento antes de la adición de la diana.	24 horas
Concentración de la diana	100 µg/ml
Volumen de la diana	1 ml
Tiempo de crecimiento para recogida de extractos.	72 horas
Temperatura de crecimiento	28°C

Tabla 1.

Dependiendo del número de muestras se prepara un volumen determinado de reactivos y se sigue el ejemplo de protocolo ilustrado en la figura 3A. El kit usado es el LanthaScreen® TR-FRET Coactivator Assay (LifeScience). La fluorescencia es detectada en el EnVision® Perkin Elmer Multilabel Reader 2014, en donde el anticuerpo marcado con Terbio se excita a una longitud de onda de 340 nm, y la emisión de fluorescencia del Terbio y el coactivador son medidas a longitudes de 490 y 520 nm respectivamente. El resultado del ensayo es la ratio entre la fluorescencia del aceptor y donador (A/D). Para determinar cuáles de estos ratios son estadísticamente significativos, se emplea un parámetro llamado límite de corte o “cut off”, el cual indica el valor umbral por encima del cual los extractos pueden considerarse estadísticamente activos. Se calcula para cada experimento gracias a un programa


$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

El ensayo bioquímico determina que muestras pueden contener productos de la biotransformación del sustrato, pero no es específico para determinar la hidroxilación en C1. Para confirmar que esos “hits” contienen los metabolitos de interés, necesitamos una confirmación extra con un método biofísico. Debido a la naturaleza apolar de nuestros sustratos y productos, utilizamos cromatografía de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC), consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada, utilizamos un 1100 Series® de Agilent Technologies. El protocolo de la cromatografía no puede ser revelado por razones de confidencialidad. Para incrementar la sensibilidad del método cromatográfico la detección se realiza mediante espectrometría de masas usando un Quaternary 1200 Series® de Agilent Technologies. Una vez separado el compuesto de interés se procede a su identificación gracias a la espectrometría de masas. El equipo identifica la masa de los iones filtrados en el cuadrupolo y los representa en un espectro de picos. Nuestro sistema de LCMS presenta un límite de detección de 200 ppb, suficiente para analizar los extractos que en el ensayo bioquímico tuvieron una señal de más del 50%. Todas las muestras activas en el ensayo bioquímico que tuvieron una señal menor del 50 %, son enviadas a EE. UU para una posterior cuantificación, ya que nuestro equipo colaborador dispone de un LC-MS/MS con un límite de detección de 2 ppb, sensibilidad similar al ensayo bioquímico.

dianas - Vol 2 | No 1 | Marzo 2013 | e20130306 - 5

Se realizó un HTS “High Throughput Screening” de dos copias de las primeras 15 placas del proyecto, y se obtuvo una correlación aceptable entre ellas a pesar de la presencia de algunas muestras dispersas que podrían significar falsos positivos o negativos. Según la distribución de estos puntos, se concluyó la existencia un mayor número de falsos positivos que de falsos negativos. Debido a estas dispersiones la sensibilidad del kit fue evaluada realizando un IC₅₀ con estándares comerciales diluidos (figura 5) y se observó que la curva del estándar verde, correspondiente a la hidroxilación en C1, da señal a concentraciones de subnM, es decir a concentraciones muchos más pequeñas que los demás estándares.

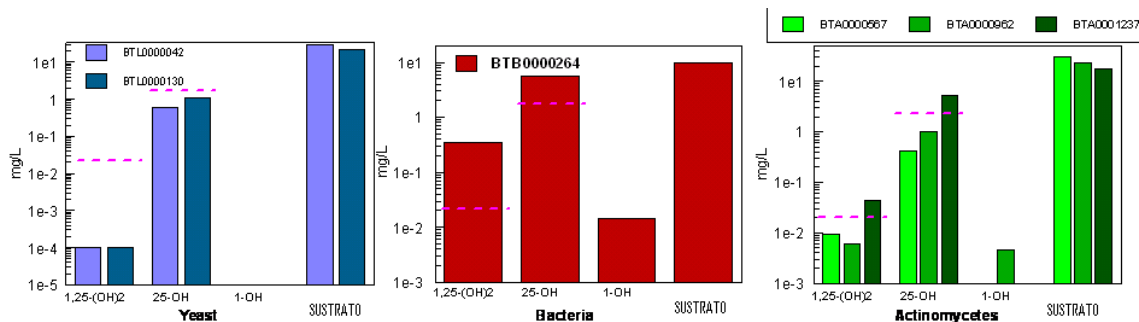


Figura4. Representación de los microorganismos con mejor perfil de biosíntesis.

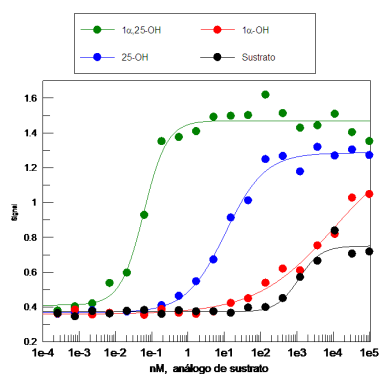


Figura 5. IC 50 de los derivados del sustrato.

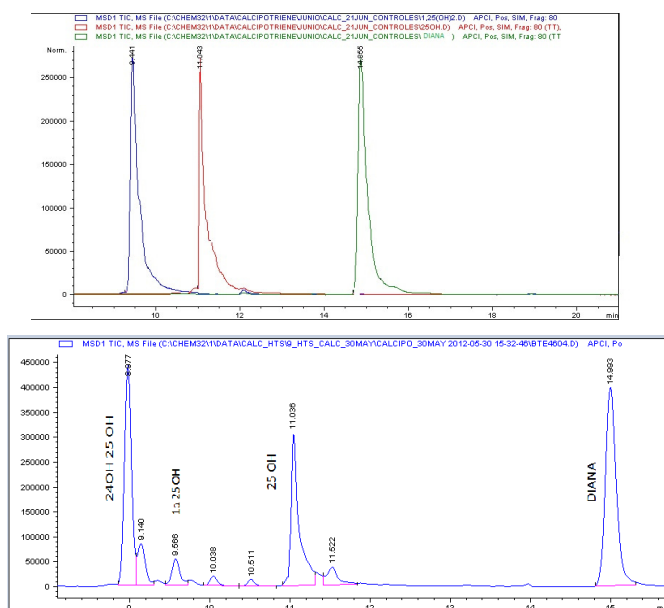


Figura6. Espectros de estándares (superior) y bacteria (inferior).

HPLC.

Como ya se ha mencionado, este “screening” involucra el análisis de una gran cantidad de muestras, 6630 en total, por tanto no es posible presentar los espectros hallados en LC-MS de todos los “hits” obtenidos.

Solo se incluyen los espectros de muestras que han resultado ser de gran interés y que además se presentan repetitivamente en el “screening”, así como también los picos de las cepas control y los estándares usados.

Discusión

La aplicación del ensayo bioquímico ha servido como primer cribado para la identificación de cepas que lleven a cabo la hidroxilación del sustrato en C1. Los resultados de estos ensayos han permitido identificar un buen número de “hits”, especialmente entre los actinomicetos como era de esperarse. Es interesante resaltar que todas las campañas pertenecientes a una misma especie de microorganismo, han arrojado números de candidatos muy distintos, reflejando así la forma tan variable como están organizadas las muestras en la colección. La sensibilidad del TR-FRET tuvo que ser verificada y se observó que se mantiene a lo largo del tiempo. Una posible explicación a la variabilidad de ciertas muestras, es que aunque el ensayo es sensible, hay problemas con la reproducibilidad, tal vez por errores en la dispensación de los equipos o debido a la naturaleza de la muestra es decir, un cultivo en donde hay un gran cantidad de moléculas las cuales pueden inhibir la unión de la diana a su receptor específico impidiendo la emisión de la señal o de manera contraria, unirse de manera inespecífica y producir señal. Debido a estas razones y a la falta de especificidad en el ensayo bioquímico por la hidroxilación en C1, debe realizarse un perfilado biofísico con un equipo que nos permita llegar a límites de sensibilidad similares a los del ensayo bioquímico. En consecuencia, no siempre ha existido una buena correlación entre el ensayo bioquímico y el biofísico. Todo esto indica que a nivel biológico hay un mundo de acontecimientos que son muy difíciles de predecir y que nos llevan cada vez a buscar maneras de solventar estas situaciones. Hasta la fecha de redacción de este trabajo, se han analizado todas las especies de actinomicetos, levaduras y bacterias, lo que corresponde a un 66% de la colección, y la parte final del “screening” es la evaluación de los hongos. De la gran cantidad de hits obtenidos se distinguen ciertos patrones en los espectros de LC-MS. Muchas muestras exhiben picos de hidroxilación en 24,25(OH)₂ y también picos de buena señal en 25 (OH) en 25 (figura 6B). Pocas muestras poseen picos de 1 α ,25(OH)₂, el cual es nuestro derivado de interés, a excepción de los actinos y en particular una bacteria. Esta bacteria produjo cantidades mayores de 1 α ,25(OH)₂ y 25 (OH) que nuestra cepa de control, incluso fue capaz de hidroxilar exclusivamente al C1, es decir 1(OH), cosa que nuestro actinomiceto modelo no es capaz de realizar. Por tanto, este espécimen es uno de los candidatos más prometedores hasta ahora encontrados. Con seguridad, las síntesis que lleven a cabo estos “hits” no serán las óptimas y habrá que mejorar el rendimiento de las reacciones en fases posteriores del proyecto, posiblemente mediante la selección randomizada de cepas salvajes que puedan ser modificadas por ingeniería genética para generar microorganismos recombinantes.

Agradecimientos

Deseo agradecer a GSK por permitirme hacer parte de su familia durante el tiempo de elaboración de este proyecto; a mi tutor Emilio Álvarez y María Jesús Vázquez por sus consejos, orientaciones y enseñanzas; a Francisco de Dios por su paciencia y de manera especial a mi amada Laura, ya que sin su apoyo nunca hubiese podido iniciar ni culminar este Máster.

Referencias

1. F. O. Nestle, D. H. Kaplan, J. Barker, Psoriasis. N. Engl. J. Med. 361, 496–509 (2009).
2. L. Ochaita, S. Fernández, Actualización en el tratamiento de la psoriasis. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. Vol 25, 4 (2001).
3. Arnett FC, et al. Psoriasis and psoriatic arthritis associated with human immunodeficiency virus infection. Rheumatic Diseases Clinics of North America 1991;17:59–78. [PubMed: 2041889]
4. Rongioletti F, et al. Psoriasis Induced or Aggravated by Drugs. The Journal of Rheumatology 2009; 83:59–61. [PubMed: 19661544]
5. Mee JB, et al. The psoriatic transcriptome closely resembles that induced by interleukin-1 in cultured keratinocytes: dominance of innate immune responses in psoriasis. Am J Pathol 2007;171:32–42. [PubMed: 17591951]
6. Halprin KM. Epidermal “turnover time”--a re-examination. Br J Dermatol 1972; 86:14–19. [PubMed:4551262]
7. C. Fulton, G. M. Anderson, M. Zasloff, R. Bull, and A. G. Quinn, “Expression of natural peptide antibiotics in human skin,” *The Lancet*, vol. 350, no. 9093, pp. 1750–1751, 1997.
8. J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, and J.-M. Schroder, “A peptide antibiotic from human skin,” *Nature*, vol. 387, no. 6636, p. 861, 1997.

9. P. Y. Ong, T. Ohtake, C. Brandt, et al., “Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 15, pp. 1151–1160, 2002.
10. C. Johansen, K. Moeller, K. Kragballe, L. Iversen, The activity of caspase-1 is increased in lesional psoriatic epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 127, 2857–2864 (2007).
11. J. Renne, V. Schafer, T. Werfel, M. Wittmann, Interleukin-1 from epithelial cells fosters T celldependent skin inflammation. *Br. J. Dermatol.* 162, 1198–1205 (2010).
12. A. Stutz, D. T. Golenbock, E. Latz, Inflammasomes: Too big to miss. *J. Clin. Invest.* 119, 3502–3511 (2009).
13. Y. Dombrowsky (y 13 autores más). Cytosolic DNA Triggers Inflammasome Activation in Keratinocytes in Psoriatic Lesions. *Sci Transl Med* vol 3, 82ra38 (2011)
14. Zhang, J. H., T. D. Chung & K. R. Oldenburg, (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen.* 4: 67-73.